

09.06.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 27 JUL 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 6月10日

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第164488号

出願人  
Applicant(s):

岡本 宏

10/009178

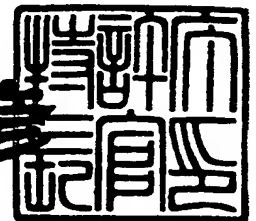
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3054031

【書類名】 特許願

【整理番号】 OKT-101

【提出日】 平成11年 6月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区角五郎 2-15-3-205

【氏名】 岡本 宏

【特許出願人】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区角五郎 2-15-3-205

【氏名又は名称】 岡本 宏

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 R e g 結合蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 2】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、Reg蛋白質と結合活性を有する蛋白質。

【請求項 3】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードし、Reg蛋白質と結合活性を有する蛋白質。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNA

。

【請求項 5】 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む、請求項 4 に記載のDNA。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 に記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項 7】 請求項 6 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の宿主細胞を培養し、該細胞内で発現した組み換え蛋白質を、該培養細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項 1 0】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質の部分ペプチド

。

【請求項 1 1】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも 1 5 塩基の鎖長を有するDNA。

【請求項 1 2】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程

、

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択す

る工程、を含む方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料存在下で請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質とを接触させる工程、

(b) 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質との結合活性を検出する工程、

(c) 該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 3 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物。

【請求項 1 5】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質をその表面に発現する細胞にReg蛋白質を接触させる工程、

(b) Reg蛋白質による刺激に応答した該細胞の変化を検出する工程、および

(c) 被検化合物非存在下において検出した場合（対照）比較して、該細胞の変化を増強または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 6】 該細胞の変化が、細胞増殖活性または細胞のDNA合成活性の変化である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】 請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物。

【請求項 1 8】 請求項 1 4 または 1 7 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

【請求項 1 9】 糖尿病治療薬である、請求項 1 8 の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Reg蛋白質に結合する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにこれ

らの製造および用途に関する。

【0 0 0 1】

【従来の技術】

膵ランゲルハンス島β細胞は生体における唯一の血糖降下因子インスリンを産生する。従来、膵β細胞は一旦傷害され細胞数が減少すると容易に再生増殖しないと考えられ、これが糖尿病発症の重要な要因であり、同時に原因に基づく根本的な糖尿病治療が出来ない理由とされてきた。

【0 0 0 2】

従来、糖尿病治療はインスリンの投与または、スルホニルウレア系の経口糖尿病薬が投与される。しかしインスリン投与は対症療法であり、同時に生理的血中インスリン濃度を維持することが難しく、さらに、動脈硬化症、神経障害、眼病変を進行させるなど、糖尿病の合併症治療を考えた場合にはその治療には限界があった。また経口糖尿病薬は副作用として長期投与における冠動脈硬化症や膵臓への過剰な負荷によると思われるインスリン分泌能の低下などの副作用があった。

【0 0 0 3】

本発明者らは実験的に膵β細胞を再生増殖させることに成功し (Yonemura, Y. et al. (1984) Diabetes 33, 401-404)、再生時に特異的に発現する遺伝子を単離してReg (Regenerating gene) と命名した (Terazono, K. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 2111-2114)。さらに、Reg遺伝子産物であるReg蛋白質が膵β細胞の再生増殖因子であることを明らかにし、糖尿病モデル動物を用いた実験から、Reg蛋白質投与やReg遺伝子の活性化、さらにはReg遺伝子導入による糖尿病治療の可能性を示した (Watanabe, T. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3589-3592; Gross, D.J. et al. (1998) Endocrinology 139, 2369-2374; Okamoto, H. (1999) J. Mol. Med. 77, 74-79)。

【0 0 0 4】

Reg蛋白質はインスリン投与の弱点を補う膵臓β細胞の増殖因子として糖尿病治療への応用が期待されるが、分子量が大きく、経口投与が難しいことや、さらに高分子蛋白質の生体内におけるターゲッティングが困難であるなど、臨床応用

には数多くの技術的課題が存在する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、Reg蛋白質に結合する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。特に本発明の蛋白質は、糖尿病に対する新しい治療薬の開発に有用である。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、膵β細胞系細胞に対するReg蛋白質の作用を調べるため、酵母を用いて製造した組換えReg蛋白質を、ラットインスリノーマ細胞由来細胞株RINm5Fに添加する実験を行った。その結果、Reg蛋白質添加によりRINm5F細胞のBrdU取り込みは有意に増加し、該細胞はReg蛋白質により増殖が促進されることが判明した。次に本発明者らは、Reg蛋白質を<sup>125</sup>Iで標識し、RINm5F細胞に添加してその結合活性を調べた。その結果、Reg蛋白質の濃度依存的なRINm5F細胞への結合が観察され、その結合は過剰量の非標識Reg蛋白質により阻害されることから特異的なものと考えられた。これらの結果は、膵β細胞にはReg蛋白質受容体が発現しており、Reg蛋白質の結合により細胞増殖が促進されることを示唆している。

【0007】

本発明者らは、Reg蛋白質受容体として機能するReg結合蛋白質を単離するため、ラット膵ランゲルハンス島 polyA(+) RNAからファージベクターによる発現cDNAライブラリーを構築し、標識したReg蛋白質を用いたウェストウェスタン法によりReg結合蛋白質をコードする遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、364アミノ酸からなる蛋白質をコードする新規遺伝子を単離することに成功した。

【0008】

この遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクターに導入し、COS-7細胞で発現させ、組換えReg蛋白質を該細胞に添加したところ、Reg蛋白質はCOS-7細胞に特異的に結合することが確かめられた。これらの事実から、単離されたReg結合蛋白質は、細胞表面に発現し、Reg蛋白質に対する受容体として機能し、膵β細胞などにお

いて細胞増殖等の制御を行っていると考えられる。従って、本発明のReg結合蛋白質やその遺伝子は、糖尿病の病因メカニズムを解明するための有用なツールとなり、また、糖尿病治療薬開発への応用も可能であると考えられる。

【0009】

本発明は、Reg蛋白質に結合する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、Reg蛋白質と結合活性を有する蛋白質、

(3) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードし、Reg蛋白質と結合活性を有する蛋白質、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNA、

(5) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含む、(4)に記載のDNA、

(6) (4) または (5) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(7) (6) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(8) (7) に記載の宿主細胞を培養し、該細胞内で発現した組み換え蛋白質を、該培養細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、(1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質の製造方法、

(9) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質に対する抗体、

(10) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質の部分ペプチド、

(11) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、

(12) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料存在下で (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質とを接触させる工程、

(b) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質との結合活性を検出する工程、

(c) 該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(14) (13) に記載の方法により単離されうる、(1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物、

(15) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、(1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質をその表面に発現する細胞にReg蛋白質を接触させる工程、

(b) Reg蛋白質による刺激に応答した該細胞の変化を検出する工程、および

(c) 被検化合物非存在下において検出した場合(対照)比較して、該細胞の変化を増強または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、

(16) 該細胞の変化が、細胞増殖活性または細胞のDNA合成活性の変化である、(15) に記載の方法、

(17) (15) または (16) に記載の方法により単離されうる、(1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物、

(18) (14) または (17) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物

(19) 糖尿病治療薬である、(18) の医薬組成物、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、脾臓で発現しReg蛋白質に結合する新規な蛋白質(Reg結合蛋白質)



に関する。本発明に含まれる、単離されたラット「Reg結合蛋白質」cDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによりコードされる「Reg結合蛋白質」のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

#### 【0011】

本発明のラット「Reg結合蛋白質」は、364アミノ酸残基の蛋白質をコードするオープンリーディングフレームを含有する。本発明のラット「Reg結合蛋白質」は、細胞表面に発現し、Reg蛋白質と結合する活性を有する。前述のように、Reg蛋白質は膵β細胞の再生時に特異的に発現する再生増殖因子であり、その蛋白質や遺伝子は糖尿病への治療の可能性が示されている。本発明の蛋白質は、このReg蛋白質の受容体として機能し、膵β細胞の増殖制御を含む細胞の生理機能の調節に関与していると考えられる。従って、「Reg結合蛋白質」は糖尿病の病原のメカニズムを解明するための研究対象として、また膵β細胞の機能が関与する疾患（糖尿病など）に対する治療剤開発のためのツールとしての利用が考えられる。

#### 【0012】

さらに糖尿病以外にも、消化管腫瘍（Asahara, M. et al., *Gastroenterology* 111, 45-55 (1996); Fukui, H. et al., *Gastroenterology* 115, 1483-1493 (1998)）、神経変性症（Livesy, F.J. et al., *Nature* 390, 614-618 (1997)）、膵炎（Christa, L. et al., *Am. J. Physiol.* 271, G993-G1002 (1996); Ortiz, E. et al., *Gastroenterology* 114, 808-816 (1998)）などの治療や予防のための医薬品開発にも有用である。また、腫瘍などにおいてReg蛋白質-Reg結合蛋白質の異常（過剰刺激）が起こる場合には、可溶型のReg結合蛋白質の投与により過剰刺激を抑制し、腫瘍の増殖等を抑えることが可能であり、Reg結合蛋白質自体を治療に応用することも考えられる。

#### 【0013】

本発明においては、Reg蛋白質と結合する活性を有する限り、ラット「Reg結合蛋白質」と構造的に類似した蛋白質も含まれる。このような構造的に類似した蛋白質には、「Reg結合蛋白質」の変異体や他の生物由来の「Reg結合蛋白質」が含まれる。

## 【0014】

このような蛋白質は、当業者であれば、例えば、公知の変異導入法を用いて調製することができる。当業者に公知の蛋白質中のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法 (Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488)、Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA) 法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275)、PCR-制限酵素法 (Ito, W. et al. (1991) Gene 102, 67-70)、ODA-PCR法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Ito, W. et al. (1991) Gene 102, 67-70) などが挙げられる。蛋白質におけるアミノ酸の改変は、人為的に行うのであれば、通常、50アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。

## 【0015】

また、蛋白質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにReg蛋白質に結合する活性を有する限り、人為的なまたは自然界におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿入により天然型ラット「Reg結合蛋白質」(配列番号: 2) に対してアミノ酸配列が異なる蛋白質も、本発明に含まれる。

## 【0016】

置換されるアミノ酸は、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましいと考えられる。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

## 【0017】

本発明において、ラット「Reg結合蛋白質」のアミノ酸が欠失した蛋白質には、細胞外領域のみを有する蛋白質が含まれる。また、ラット「Reg結合蛋白質」に対してアミノ酸が付加した蛋白質には、ラット「Reg結合蛋白質」と他のペプチドとの融合蛋白質が含まれる。

## 【0018】

また、Reg蛋白質に結合する活性を有する、ラット「Reg結合蛋白質」と構造的

に類似した蛋白質の調製は、公知のハイブリダイゼーション技術（サμβロック他編集、モレキュラー・クローニング 第2版，コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー，1989年（Samblok, J. et al.(1989) Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press））やポリメラーゼ連鎖反応技術（サμβロック他編集、モレキュラー・クローニング 第2版，コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー，1989年（Samblok, J. et al.(1989) Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press）； Innis, M.A. et al., PCR protocols, Academic Press (1990)）を利用して行うことができる。即ち、当業者にとってはラット「Reg結合蛋白質」cDNA配列（配列番号：1）若しくはその一部をプローブとして、また、ラット「Reg結合蛋白質」cDNA（配列番号：1）に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、種々の他の生物からラット「Reg結合蛋白質」cDNAと相同性の高いDNAを単離し、さらに単離したDNAからラット「Reg結合蛋白質」と構造的に類似した蛋白質を得ることが常套手段となっている。

## 【0019】

本発明においては、Reg蛋白質に結合する活性を有する限り、ラット「Reg結合蛋白質」cDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質を包含する。このような蛋白質を単離する他の生物としては、例えば、ヒト、サル、マウス、ウサギ、ヤギ、ウシ、ブタ、イヌなどが挙げられるが、これらに制限されない。このような蛋白質をコードするDNAを単離するには、例えば、これら生物の脾ランゲルハンス島β細胞が材料として適していると考えられる。

## 【0020】

ラット以外の生物に由来する「Reg結合蛋白質」をコードするDNAは、通常、ラット「Reg結合蛋白質」cDNAの塩基配列（配列番号：1）と高い相同性を有する。高い相同性とは、塩基配列レベルで少なくとも60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは99%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性は、FASTA（長い範囲で配列の類似性を保っているものを検索）、BLAST（局所的に高い類似性を有する配列を検索）、SSEARCH（Smith-Waterman algorithmを採用した検索）により決定することができる。これらは日本DNA

データベースなどの公知の遺伝子データベース、ホームページで利用することが可能である。

## 【 0 0 2 1 】

ラット「Reg結合蛋白質」cDNAを利用してラット「Reg結合蛋白質」と機能的に同等な蛋白質をコードするcDNAを他の生物から単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。一例を示せば、6×SSC / 5×FBP / 0.5% SDS / 0.2mg/ml 鮭（鯨）精子DNA / 10%ホルムアミド溶液で42℃（低ストリンジェントな条件）でハイブリダイゼーションを行うことができる。好ましくは、6×SSC / 5×FBP / 0.5% SDS / 0.2mg/ml 鮭（鯨）精子DNA / 30%ホルムアミド溶液で42℃（中間的なストリンジェントの条件）でハイブリダイゼーションを行う。さらにこのましくは、6×SSC / 5×FBP / 0.5% SDS / 0.2mg/ml 鮭（鯨）精子DNA / 10%ホルムアミド溶液で50℃（高ストリンジェントな条件）でハイブリダイゼーションを行う。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度やホルムアミドの濃度、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

## 【 0 0 2 2 】

本発明の蛋白質は、天然の蛋白質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換え蛋白質として調製することができる。天然の蛋白質は、例えば、「Reg結合蛋白質」が発現していると考えられる組織（例えば、腓ラングルハンス島β細胞）の抽出液に対し、後述する「Reg結合蛋白質」に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換え蛋白質は、後述するように「Reg結合蛋白質」をコードするDNAで形質転換した細胞を培養し、これら蛋白質を発現させ回収することにより調製することが可能である。

## 【 0 0 2 3 】

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明の蛋白質のうち、Reg蛋白質との結合部位に相当するペプチドが挙げられる。本発明の蛋白質の部分ペプチドは、生体

投与することで、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニスト、Reg蛋白質の拮抗剤等としての利用が考えられる。これら部分ペプチドは、本発明の蛋白質を介したシグナル伝達の活性化剤や阻害剤として有用である。また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明の蛋白質のN末端領域の部分ペプチドや、C末端領域の部分ペプチドが挙げられ、これらのペプチドは抗体の調製に利用することができる。本発明の蛋白質に特異的なアミノ酸配列を有する部分ポリペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも9アミノ酸の鎖長を有する。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することがきでる。

## 【0024】

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNAに関する。本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、これら蛋白質をコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

## 【0025】

本発明の蛋白質をコードするcDNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>Pなどで標識し、本発明の蛋白質が発現している組織（例えば脾臓など）由来のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば脾臓など）由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>Pなどで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クロ

ーニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる。

#### 【0026】

これらDNAは、組換え蛋白質の生産に有用である。即ち、本発明の蛋白質をコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させた蛋白質を精製することにより本発明の蛋白質を組換え蛋白質として調製することが可能である。本発明の蛋白質は精製または粗精製蛋白質として、また、哺乳動物細胞で発現させ、膜に結合した形態として調製すること等が可能である。

#### 【0027】

具体的な宿主ベクター系としては、例えば E. coli-pGEX系（アマシャムファルマシアバイオテック；GSTとの融合蛋白質として発現）、E. coli-pHB6やpVB6系（ロッシュダイアグノスティック；6個のヒスチジンとの融合蛋白質として発現）、E. coli-pMAL系（New England Biolabs；マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として発現）、E. coli-pTYB系（New England Biolabs；Inteinとの融合蛋白質として発現、その後DTT存在下にInterin部分が切断され、目的蛋白質のみの精製が容易）、Pichia-pPIC系やpGAP系（Invitrogen）、哺乳動物細胞（例えば COS-7）-pCI-neo系（Promega）やpHook系（Invitrogen）などが挙げられる。

#### 【0028】

宿主へのベクターの導入法は、E. coliへは公知のコンピテント細胞へのトランスフォーメーションまたは電気穿孔法、Pichiaへは例えば Pichia Easy Comp Kit（実施例1参照）により調製したコンピテント細胞へのトランスフォーメーション、または電気穿孔法、哺乳動物細胞へは電気穿孔法または公知のカチオニックリピッドを用いたリポフェクション法等により行うことができる。

#### 【0029】

宿主細胞において発現させた組換え蛋白質は、公知の方法により精製することができる。また、本発明の蛋白質を、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、

グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合蛋白質の形で発現させた場合には、ニッケルカラムやグルタチオンセファロースカラム等により精製することができる。

【 0 0 3 0 】

本発明の蛋白質をコードするDNAは、また、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。例えば、ワクシニアウイルス、レトロウイルス等を用いた遺伝子治療が考え得る。治療の実際方法としては、例えば移植用の脾臓、または脾ランゲルハンス島に培養条件下でこれらの組換えウイルスを用いて「Reg結合蛋白質」を導入し、移植を行うことで脾β細胞の増殖により移植治療効果の向上と、移植用臓器の有効利用が図りうる。

【 0 0 3 1 】

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAに関する。「特異的にハイブリダイズする」とは、上記した通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAには、本発明の蛋白質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

【 0 0 3 2 】

本発明の蛋白質をコードするcDNAあるいはその配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードする遺伝子やcDNAのクローニング、あるいはPCRによる増幅に利用できる。さらに、制限断片長多型 (RFLP)、1本鎖DNA高次構造多型 (SSCP) などの方法により、遺伝子あるいはcDNAの多型あるいは異常の検出(遺伝子診断など)に利用できる。

【 0 0 3 3 】

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体に関する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。ポリクローナル抗体

は、例えば生体材料（例えば脾臓ランゲルハンス島）から調製した「Reg結合蛋白質」や、先に述べた宿主-ベクター系などで作製した組換え「Reg結合蛋白質」、または一般的なペプチド合成法により合成した部分ペプチドを抗原に公知の方法（Harlow, E. and Lane, D. Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)など）でウサギ、ヤギ、ヒツジなどを免疫してポリクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体は、生体材料（例えば脾臓ランゲルハンス島）から調製した「Reg結合蛋白質」や、先に述べた宿主-ベクター系などで作製した組換え「Reg結合蛋白質」、または一般的なペプチド合成法により合成した部分ペプチドを抗原に公知の方法（Harlow, E. and Lane, D. Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)など）で免疫したマウスやラットの脾細胞を用い、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。

ポリクローナル抗体では血清から、モノクローナル抗体ではハイブリドーマ培養上清またはハイブリドーマを接種した動物の腹水から硫酸分画、プロテインGセファロースカラム、抗原を固定したアフィニティーカラムなどの一般的な生化学的手法で抗体を精製する。

#### 【0034】

これにより調製された抗体は、本発明の蛋白質のアフィニティー精製のために用いられる他、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常に起因する疾患の検査や診断、本発明の蛋白質の発現量の検出などに利用することが可能である。具体的には、例えば組織または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。また、本発明の抗体を抗体治療に用いることも考えられる。抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。この場合は、ヒトリンパ球とHGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損マウスミエローマを融合しHAT培地にてヒト-マウスヘテロハイブリドーマを選択する。このミエローマ細胞を、「Reg結合蛋白質」を抗原とした公知のRIA、ELISA法で選択し、「Reg結合蛋白質」に対するヒト型モノクローナル抗体を産生するクローンを得る。抗体の精製は上記の通り行うことができる。



## 【 0 0 3 5 】

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。このようなスクリーニングは、（a）本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、（b）本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および（c）本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

本発明の蛋白質は、スクリーニングの手法に応じて、精製蛋白質として、細胞表面に発現された形態として、細胞膜画分としてスクリーニングに用いることができる。

## 【 0 0 3 6 】

被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

## 【 0 0 3 7 】

本発明のタンパク質と結合するタンパク質のスクリーニングは、例えば、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングを実施することが可能である。

## 【 0 0 3 8 】

さらに、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される組織若しくは細胞（例えば、膵β細胞など）よりファージベクターを用いたcDNAライブラリーを作製し、これをアガロース上で発現させフィルターにタンパク質を固定後、標識した本発明のタンパク質を反応させ、結合するタンパク質を発現しているブランクを検出する「ウエストウエスタンブロッティング法」や

、GAL4 DNA結合領域およびGAL4転写活性化領域を、本発明のタンパク質および被検タンパク質との融合タンパク質として発現させ、GAL4 DNA結合タンパク質の結合配列を有するプロモーターの下流に連結させたレポーター遺伝子の発現を通して本発明のタンパク質と被検タンパク質との結合を検出する「twoハイブリッドシステム」等に従い実施することも可能である。

## 【0039】

また、固定化した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニングにより本発明のタンパク質に結合する化合物を単離する方法も当業者に周知の技術である。

また、BIACORE (Biacore社製) を利用したスクリーニングやマイクロフィジオメーター (モレキュラーデバイス社製) などを用いて Reg結合蛋白質を強制発現させた培養細胞の酸分泌速度の変化をモニターする方法などが考えられる。

## 【0040】

また、本発明は、本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法に関する。このようなスクリーニングは、(a) 被検試料存在下で本発明の蛋白質とReg蛋白質とを接触させる工程、(b) 本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合活性を検出する工程、(c) 該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

## 【0041】

本発明の蛋白質は、精製蛋白質として、細胞表面に発現された形態として、細胞膜画分としてスクリーニングに用いることができる。また、Reg蛋白質は、通常、精製蛋白質としてスクリーニングに用いる。Reg蛋白質としては、例えば、ヒトREG I $\alpha$ やラットReg Iを用いることができる。これらの蛋白質は、組換え蛋白質として調製してもよい (実施例1参照)。Reg蛋白質は、必要に応じて [<sup>125</sup>I] 等の放射性同位元素等で標識しておいてもよい。

被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用

いることができる。

【 0 0 4 2 】

スクリーニングは、例えば、以下の如く行なうことができる。本発明の蛋白質を発現した細胞や、それから調製された膜画分に、被検試料の存在下で標識したリガンド（Reg蛋白質）を接触させ、本発明の蛋白質に結合する標識されたりガンドの量を測定する。被検試料が存在しない場合と比較して、このリガンドの量を低下させるような化合物を選択する。本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合は、上記BIACOREやマイクロフィジオメーターを用いて測定することもできる。これにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアンタゴニストやアゴニストの候補となる。

【 0 0 4 3 】

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。このようなスクリーニングは、（a）被検試料の存在下で、本発明の蛋白質を表面に発現する細胞にReg蛋白質を接触させる工程、（b）Reg蛋白質刺激に応答した該細胞の変化を検出する工程、および（c）被検化合物非存在下において検出した場合（対照）比較して、該細胞の変化を増強または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

【 0 0 4 4 】

本発明の蛋白質をその表面に発現する細胞は、本発明の蛋白質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、これにより構築したベクターを適当な宿主細胞に導入することにより調製することができる。宿主細胞としては、例えば、RI Nm5F細胞、CHO細胞、COS-7細胞などの細胞が挙げられる。ベクターとしては pCI-neo（Promega）、pHook（Invitrogen）などが挙げられる。

【 0 0 4 5 】

被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、本発明の蛋白質との結合活性を指標とした上記のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。

## 【0046】

Reg蛋白質は、通常、精製蛋白質としてスクリーニングに用いる。Reg蛋白質としては、例えば、ヒトREG I $\alpha$ やラットReg Iを用いることができる。これらの蛋白質は、組換え蛋白質として調製してもよい（実施例1参照）。

## 【0047】

スクリーニングにおいては、被検試料存在下でのReg蛋白質刺激に応答した上記細胞の変化を検出する。Reg蛋白質刺激に応答した細胞の変化としては、例えば、細胞増殖活性の変化、細胞のDNA合成活性の変化、細胞のアポトーシスの程度の変化、本発明の蛋白質やそのシグナルを伝達する蛋白質のリン酸化、細胞内の特定の遺伝子の発現の変化などが挙げられるが、これらに制限されない。

## 【0048】

細胞のDNA合成は、例えば実施例に示されるように 5'-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込みを測定することで検出することができる。また、<sup>3</sup>H-チミジンを細胞に添加し、細胞内に取り込まれた放射活性を測定することにより行ってもよい。<sup>3</sup>H-チミジンの細胞への取り込み試験は、DNA合成促進または抑制効果の測定に一般的に用いられている。この方法は比較的多量のサンプルを扱え、感度も高いなどの利点を有している。DNA合成を促進または抑制する化合物のスクリーニングにおいては、具体的には、例えば、細胞をマルチウェルプレート等に蒔き1～2日ほど培養後、被検試料を含む培地に交換し、24時間など一定時間インキュベートし、その後、例えば 1 $\mu$ Ci/ml の <sup>3</sup>H-チミジンを添加する。インキュベート後、培地を除き細胞を洗浄してから 10% TCAを加え20分ほど氷上に置き、氷冷した 5% TCAで洗浄する。0.5N NaOHで細胞を溶解し、氷上に10分置いてから 1/2容の 1N HClを加え穏やかに混合し、さらに40% TCAを終濃度10%になるように加えて穏やかに混合する。20分氷上に静置した後、Whatman GF/C フィルターなどで濾過して不溶物を回収する。100%エタノールで3回洗浄し乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターで計測する。

## 【0049】

また、細胞の増殖は、細胞数の計測やコロニー数の計測、または細胞にMTTもしくはAlamar Blueなどの色素を加え、細胞数に依存した発色を測定することに

より行うことができる。MTT法はMTT (3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム ブロマイド) による発色によって細胞増殖活性を測定するもので、生細胞のミトコンドリアの呼吸鎖に作用し、MTTホルマザンを生成する。この生成量は細胞数を反映する。具体的には、例えば、96ウェルプレートで細胞を培養し、被検試料を作用させたのち、5 mg/ml MTT溶液を10 $\mu$ l加え、4時間インキュベートする。0.04N HCl/イソプロパノールを100 $\mu$ l加え、よく混合し、数分放置する。マイクロプレートリーダーを用いて、レファレンス波長 630nm、テスト波長570nmで測定する。

#### 【0050】

蛋白質のリン酸化は、セリン、スレオニン、またはチロシン残基に起こると考えられる。これらリン酸化の変化は、抗リン酸化セリン、スレオニン、またはチロシン抗体によるウェスタン法や免疫沈降法により、細胞内蛋白質のリン酸化状態を測定することで検出が可能である。リン酸化される蛋白質としては、細胞増殖に関与するMAPキナーゼ系やSTAT系、あるいはFos-Jun系蛋白質などが予想されるが、これら例示した蛋白質に限らない。

#### 【0051】

上記蛋白質リン酸化などにより、種々の遺伝子の転写が誘導されたり抑制されたりすることが知られている。本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合に依存した特定の遺伝子の発現の変化は、レポーター遺伝子を利用して検出することができる。即ち、該遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結し、レポーター遺伝子の発現を検出することで測定できる。また、特定の遺伝子の発現の変化は、ノーザンブロッティング法やRT-PCR法などのmRNAを検出する方法、遺伝子の翻訳産物である蛋白質を抗体などを用いて検出する方法、遺伝子の翻訳産物である蛋白質の活性を検出する方法により、測定することもできる。

#### 【0052】

これらのスクリーニングにより単離される化合物としては、例えば、①本発明の蛋白質に結合し、その活性を促進または阻害する化合物、②本発明の蛋白質またはReg蛋白質等の本発明の蛋白質のリガンドに結合し、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を促進または阻害する化合物、③本発明の蛋白質のリガンドに結合

し、その活性化を促進または阻害する化合物、④本発明の蛋白質から細胞の変化を発現するに至るシグナル伝達を促進または阻害する化合物が含まれる。

#### 【0053】

これら化合物は、本発明の蛋白質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患（例えば、膵β細胞の機能の異常に起因する疾患）の予防薬や治療薬への応用が考えられる。例えば、糖尿病の治療薬への応用が考えらる。

#### 【0054】

本発明の蛋白質または本発明のスクリーニングにより単離される化合物を薬剤として用いる場合には、本発明の蛋白質やスクリーニングにより単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせる製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

#### 【0055】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 ヒトREG 蛋白質 (REG I $\alpha$ ) およびラットReg蛋白質 (Reg I) 発現ベクターの構築

ヒトREG I $\alpha$  cDNA (Terazono, K. et al., J. Biol. Chem. 263, 2111-2114 (1998)) の蛋白質コード領域の全長をPichia発現用ベクターpPIC3.5 (Invitrogen社製) の酵母アルコールオキシダーゼプロモーターの下流のSnaBI/AvrIIサイト

にリンカーを用いて挿入し、発現ベクターを構築した。ラットReg I cDNA (Tera zono, K. et al., 上記) の蛋白質コード領域の全長も同様に、pPIC3.5のSnaBI/NotIサイトにリンカーを用いて挿入した。これら2種類の発現ベクターDNAをCsCl法で精製し、Pichia Easy Comp Kit (Invitrogen社製) を用いて調製したコンピテント細胞 (Pichia GS115株) に導入した。発現ベクター導入細胞は、ヒスチジンを含まない培地で増殖できるようになることで選択した。発現ベクター導入細胞の中から、メタノール添加により培地中に産生・分泌されるヒトREG蛋白質・ラットReg蛋白質が最大となるクローンを選択した。

【0056】

〔実施例2〕 ヒトREG蛋白質 (REG I $\alpha$ ) およびラットReg蛋白質 (Reg I) の調製

上記ヒトREG蛋白質またはラットReg蛋白質を産生するPichia (Pichia pastori s) をBMGY培地 (1% 酵母エキストラクト、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0)、1.34% Yeast Nitroge Base、0.00004% ビオチン、1% グリセロール) で 28~30℃で 16~18時間前培養後、BMGY培地でOD600が 2~5 にまるまで大量培養を行った。酵母を遠心分離で回収し、OD600が 1 になるようにBMMY培地 (1% 酵母エキストラクト、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0)、1.34% Yeast Nitroge Base、0.00004% ビオチン、0.5% メタノール) に再懸濁し、28~30℃で 3~4日培養した。この間24時間おきに終濃度0.5%になるようにメタノールを加えた。遠心分離で培養液を回収し、酢酸を加え pHを 3.5 に調整した。pH調整済みの培養液を 50mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) で平衡化した STREAMLINE SP (Pharmacia) にアブライし、50mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) で洗浄後、50mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) / 0.5M NaCl で溶出した。産生された蛋白質がそれぞれヒトREG蛋白質またはラットReg蛋白質であることは、マスペクトロメトリーで確認した。

【0057】

〔実施例3〕 ラットインスリノーマ由来培養細胞RINm5F細胞に対するREG蛋白質の添加効果

ラットインスリノーマ由来の培養細胞RINm5F細胞 (Zenilman, M.E. et al., G

astroenterology 110, 1208-1214 (1996)) にREG蛋白質を添加し、5'-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込み (細胞増殖活性) を測定した。まず  $5 \times 10^5$  細胞/ml の RINm5F 細胞 100  $\mu$ l を 96 穴プレートに蒔き、37°C で 2 日間培養した。その後、培養液を下記に示す培養液 100  $\mu$ l に置換した。ヒト REG I  $\alpha$  は実施例 2 で調製したものをを用いた。

培地 + 1% FCS

培地 + 1% FCS + ヒト REG I  $\alpha$  (1 nM; 0.016  $\mu$ g/ml)

培地 + 1% FCS + ヒト REG I  $\alpha$  (10 nM; 0.16  $\mu$ g/ml)

培地 + 1% FCS + ヒト REG I  $\alpha$  (100 nM; 1.6  $\mu$ g/ml)

培地 + 1% FCS + ヒト REG I  $\alpha$  (1000 nM; 16  $\mu$ g/ml)

37°C で 24 時間インキュベートし、BrdU ラベリング溶液 (10mM の BrdU 原液を培地で 100  $\mu$ M になるように希釈したもの) を 10  $\mu$ l / ウェル加えた (終濃度 10  $\mu$ M BrdU)。37°C で 12 時間インキュベートしたのち培地を除き、FixDenat (ロッシュダイアグノスティック社製) を 200  $\mu$ l / ウェル加えた。室温で 15 分間インキュベートしてから FixDenat 溶液を除き、抗 BrdU-POD 抗体 (ストック溶液 (ロッシュダイアグノスティック社製) を 1/100 希釈したもの) を 100  $\mu$ l / ウェル加えた。室温で 60 分間インキュベートし、抗 BrdU-POD 抗体溶液を除いた後、洗浄液 (10 $\times$  洗浄液 (ロッシュダイアグノスティック社製) を 1/10 希釈したもの) 200  $\mu$ l / ウェルで 3 回リンスした。基質溶液 (ロッシュダイアグノスティック社製) を 100  $\mu$ l / ウェル加え、十分な発色が見られるまで室温でインキュベートした。各試料は ELISA リーダーを用いて 370nm の吸光度を測定した (レファレンス波長: 約 492nm)。

その結果、REG 蛋白質の濃度依存的な細胞増殖が見られた (図 1)。

【 0 0 5 8 】

【実施例 4】 RINm5F 細胞に対する Reg 蛋白質の結合活性の測定方法

まず、以下のようにして、 $[^{125}\text{I}]$  RegI 希釈液を調製した。 $[^{125}\text{I}]$  ラット RegI 原液 (50ng/ $\mu$ l =  $\sim 3.33 \mu\text{M}$ ,  $8.6 \times 10^5$  cpm/ $\mu$ l) を DMEM で、それぞれ 1nM、333pM、100pM、33pM、および 10pM となるように希釈した。また、非標識の RegI 原液 (460ng/ $\mu$ l =  $30.6 \mu\text{M}$ ) を、 $[^{125}\text{I}]$  RegI の 100 倍濃度で含むように加えた希釈液を同様に調製した。 $4 \times 10^5$  細胞/ml の RINm5F 細胞 3ml を 6 穴プレートに蒔き、37°C で



2日間培養した。冷DMEMで洗浄後、上記 [ $^{125}\text{I}$ ] ラットRegIを含むDMEM 3mlを加えた（終濃度 10pM, 33pM, 100pM, 333pM, 1nM）。競合阻害実験においては、100倍の非標識 RegIを共存させたDMEMを用いた。氷上で2時間静置し、DMEMで3回洗浄した後、0.5~1 ml/ウェルの [100mM Tris-HCl (pH7.6), 1mM EDTA, 1% Triton X-100] を加えてリシスさせ、 $\gamma$ -カウンタで [ $^{125}\text{I}$ ] をカウントした。

その結果、大過剰の非標識Reg蛋白質により結合が阻害されており、特異的な結合に必須の分子がRINm5F細胞膜上に存在することが示された（図2）。

#### 【0059】

##### [実施例5] Reg結合蛋白質の同定と単離

ラット腭ランゲルハンス島Poly(A)<sup>+</sup> RNAを鋳型に $\lambda$  ZAP IIベクターによる腭ランゲルハンス島発現型cDNAライブラリーを作製した。実施例2で調製したラットReg蛋白質をBolton-Hunter試薬を用いて $^{125}\text{I}$ 標識し、発現型cDNAライブラリーからWest-Western法でReg蛋白質と結合するファージクローンを選択・単離した。

陽性ファージクローンからヘルパーファージを用いた *in vivo* 切り出し法でcDNAをプラスミドベクター（pBluescript SK(-), Stratagene社製）に組み換えた。ジデオキシ法でcDNAの塩基配列を決定した。その塩基配列を配列番号：1に、予想されるアミノ酸配列を配列番号：2に示す。塩基配列から推定される蛋白質は1個の疎水性アミノ酸クラスターの膜貫通領域を有する細胞膜蛋白質と考えられた。

#### 【0060】

##### [実施例6] Reg結合蛋白質のCOS-7細胞での発現

実施例5で単離したcDNAをサイトメガロウイルスプロモーターを持つ哺乳動物用発現ベクター（pCI-neo）に組み込み、Reg結合蛋白質発現ベクター（pCI-167.1）を構築した。このベクターをCOS-7細胞へエレクトロポレーション法で導入して一過性に発現させた。ベクター導入 48時間後に、実施例4と同様のプロトコールでReg結合活性を検討した。

具体的には、まず [ $^{125}\text{I}$ ] ラットRegI原液（50ng/ $\mu\text{l}$   $\sim$  3.33  $\mu\text{M}$ ,  $2.7 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$ ）をDMEMで 10nM となるように希釈した。また、非標識のRegI原液（2250ng/ $\mu\text{l}$  = 150  $\mu\text{M}$ ）を、 [ $^{125}\text{I}$ ] RegIの100倍濃度（1  $\mu\text{M}$ ）で含むようにこの液に加えた

希釈液を別に調製した。

$2.5 \times 10^5$  細胞/mlのトランスフェクトしたCOS細胞 3mlを6穴プレートに蒔き、37℃で2日間培養した。冷DMEMで洗浄後、 $[^{125}\text{I}]$ ラットRegIを含むDMEM 3mlを加えた(終濃度 10nM)。競合阻害実験においては、100倍の非標識 RegIを共存させた。氷上で2時間静置し、DMEMで3回洗浄した後、1 ml/ウェルの  $[100\text{mM Tris-HCl (pH7.6), 1\text{mM EDTA, 1\% Triton X-100}]$  を加えてリシスさせ、 $\gamma$ -カウンタで $[^{125}\text{I}]$ をカウントした。

その結果、このcDNAを導入した細胞では、ベクターのみを導入した細胞に比較して $^{125}\text{I}$ 標識Reg蛋白質との結合が著明に増大していた。また、この結合は過剰量の非標識Reg蛋白質の添加により消失した(図3)。このことから、単離されたcDNAのコードする蛋白質は哺乳動物細胞膜上でReg蛋白質と結合する分子であると考えられ、Reg蛋白質の $\beta$ 細胞再生増殖活性を担う受容体分子である可能性が考えられた。

【0061】

【発明の効果】

本発明によりRegに結合する蛋白質が提供された。Reg蛋白質は膵臓の $\beta$ 細胞の細胞増殖因子であり、同時に上皮細胞等においても細胞増殖活性を示すことが知られている。Reg結合蛋白質は膵臓 $\beta$ 細胞においてReg蛋白質と結合することにより細胞増殖に必要なシグナルを細胞内に伝達する働きを持っており、膵臓 $\beta$ 細胞はReg蛋白質とReg結合蛋白質の結合によって再生すると考えられる。このため、Reg結合蛋白質の細胞外ドメインの構造を解析し、これに結合するリガンドのアナログ物質を検索することにより、生理的な膵 $\beta$ 細胞の増殖を誘発する「糖尿病治療薬」の開発が可能である。また、Reg蛋白質は膵臓細胞において $\beta$ 細胞の過剰な増殖を引き起こさないため、インスリン投与のような過剰投与による低血糖を発現する可能性がないと考えられる。

【0062】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> OKAMOTO, Hiroshi

<120> Reg binding protein

<130> OKT-101

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1599

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (168)..(1262)

<400> 1

tcagcgagga aaatgaaatt cccattttat ttggtgcctt gtgcaggag cacactgatc 60

cctctagaac cttgtgtgtg aaaaagaggt cgagttttgt caaacagact catggttatg 120

gcaagtgatc cgacgtgacc agagtgggca agagccacag tgaactc atg aca ggc 176

Met Thr Gly

1

tat acc atg ttg cgg aat ggg gga gtg ggg aac ggt ggt cag acc tgt 224

Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Val Gly Asn Gly Gly Gln Thr Cys

5

10

15

atg ctg cgc tgg tcc aac cgc atc cgg ctg acc tgg ctg agt ttc acg 272

Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp Leu Ser Phe Thr

20

25

30

35

ctg ttc atc atc ctg gtc ttc ttc ccc ctc att gcc cac tat tac ctc 320

Leu Phe Ile Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala His Tyr Tyr Leu

40

45

50

acc act ctg gat gag gca gat gag gcc ggc aag cgc atc ttt ggc ccc 368

Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg Ile Phe Gly Pro

55

60

65

cgg gct ggc aac gag ctc tgt gag gta aag cac gtc cta gat ctt tgt 416

Arg Ala Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val Leu Asp Leu Cys

70

75

80

cgg atc cgc gag tct gtg agc gaa gag ctt cta cag cta gaa gcc aag 464

Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln Leu Glu Ala Lys

85

90

95

cgg cag gag ctg aac agc gag att gcc aag cta aac ctc aag att gaa 512

Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn Leu Lys Ile Glu

100	105	110	115	
gcc tgt aag aag agt ata gag aac gcc aag cag gac ctg ctg cag ctc				560
Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Leu Leu Gln Leu				
	120	125	130	
aag aat gtc att agc cag aca gag cac tcc tac aag gag ctg atg gcc				608
Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys Glu Leu Met Ala				
	135	140	145	
cag aac cag ccc aaa ctg tca ctg ccc atc cgg ctg ctc cct gag aag				656
Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu Leu Pro Glu Lys				
	150	155	160	
gat gac gct ggc ctt cca ccc ccc aag gtc act cgg ggt tgc cgg cta				704
Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Val Thr Arg Gly Cys Arg Leu				
	165	170	175	
cac aac tgc ttc gat tac tct cgt tgc cct ctg acg tct ggc ttt cct				752
His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr Ser Gly Phe Pro				
180	185	190	195	
gtc ttc gtc tat gac agt gac cag ttt gcc ttt ggg agc tac ctg gac				800
Val Phe Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Ala Phe Gly Ser Tyr Leu Asp				
	200	205	210	
cct ttg gtc aag cag gct ttt cag gct aca gtg aga gcc aac gtt tat				848
Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Val Arg Ala Asn Val Tyr				
	215	220	225	

gtt aca gaa aat gca gcc atc gcc tgc ctg tat gtg gtg tta gtg gga 896  
Val Thr Glu Asn Ala Ala Ile Ala Cys Leu Tyr Val Val Leu Val Gly

230

235

240

gag ata caa gag ccc gct gtg ctg cag cct gcc gac ctt gag aag cag 944  
Glu Ile Gln Glu Pro Ala Val Leu Gln Pro Ala Asp Leu Glu Lys Gln

245

250

255

ctg cat tct ctg cca cac tgg agg aca gac gga cac aac cat gtc atc 992  
Leu His Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His Asn His Val Ile

260

265

270

275

atc aat ctg tcc cgg aag tca gac aca caa aat tta ctg tac aat gtc 1040  
Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu Leu Tyr Asn Val

280

285

290

agt aca ggt cgg gcc atg gtg gcc cag tct acc ttc tat gct gcc cag 1088  
Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe Tyr Ala Ala Gln

295

300

305

tac aga gct ggc ttt gac ttg gtt gtg tca cca ctt gtc cat gcc atg 1136  
Tyr Arg Ala Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu Val His Ala Met

310

315

320

tct gaa ccc aac ttc atg gaa atc cca cgt gta act att ttt tca ctt 1184  
Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Arg Val Thr Ile Phe Ser Leu

325

330

335

ggg aga ggt gag gaa gaa caa gag aag ctg ggg gtg tgg aga ggc aga 1232  
 Gly Arg Gly Glu Glu Glu Gln Glu Lys Leu Gly Val Trp Arg Gly Arg  
 340 345 350 355

ccc ccc cca ggc tgg ggt gct ggc ccc tag actagggtgc tgaccctgg 1282  
 Pro Pro Pro Gly Trp Gly Ala Gly Pro  
 360 365

gctgggggtgc tgcgtgctac ctcccactgt gaaatcgatg gtgctcaca ttgtctcttg 1342

taatgtatgt gatttttttt taaggagaaa aagaaactat ttaagattct gaaggtgcta 1402

ctatttttgt tgccacaggc tttaaagaaa ctttctgagt ggggtggggcc ttgccactt 1462

atctttctct cctccaaatg aggagttaaa aatgttacta aattgcccgc acgtgtaatc 1522

cgctgaaaag aaaaaaaaaa aagaaaaaaaa aaaggaagga aagaaggaaa gaaggaagga 1582

aggaaggaag gaaagga 1599

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Thr Gly Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Val Gly Asn Gly Gly

1

5

10

15

Gln Thr Cys Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp Leu

20

25

30

Ser Phe Thr Leu Phe Ile Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala His

35

40

45

Tyr Tyr Leu Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg Ile

50

55

60

Phe Gly Pro Arg Ala Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val Leu

65

70

75

80

Asp Leu Cys Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln Leu

85

90

95

Glu Ala Lys Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn Leu

100

105

110

Lys Ile Glu Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Leu

115

120

125

Leu Gln Leu Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys Glu

130

135

140

Leu Met Ala Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu Leu

145

150

155

160

Pro Glu Lys Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Val Thr Arg Gly



165

170

175

Cys Arg Leu His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr Ser

180

185

190

Gly Phe Pro Val Phe Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Ala Phe Gly Ser

195

200

205

Tyr Leu Asp Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Val Arg Ala

210

215

220

Asn Val Tyr Val Thr Glu Asn Ala Ala Ile Ala Cys Leu Tyr Val Val

225

230

235

240

Leu Val Gly Glu Ile Gln Glu Pro Ala Val Leu Gln Pro Ala Asp Leu

245

250

255

Glu Lys Gln Leu His Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His Asn

260

265

270

His Val Ile Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu Leu

275

280

285

Tyr Asn Val Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe Tyr

290

295

300

Ala Ala Gln Tyr Arg Ala Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu Val

305

310

315

320

His Ala Met Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Arg Val Thr Ile  
325 330 335

Phe Ser Leu Gly Arg Gly Glu Glu Glu Gln Glu Lys Leu Gly Val Trp  
340 345 350

Arg Gly Arg Pro Pro Pro Gly Trp Gly Ala Gly Pro  
355 360

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ラットインスリノーマ由来細胞株RINm5F細胞にヒトREG蛋白質 (REG I $\alpha$ ) を添加したときのBrdUの取り込みを測定した結果を示す。

【図 2】

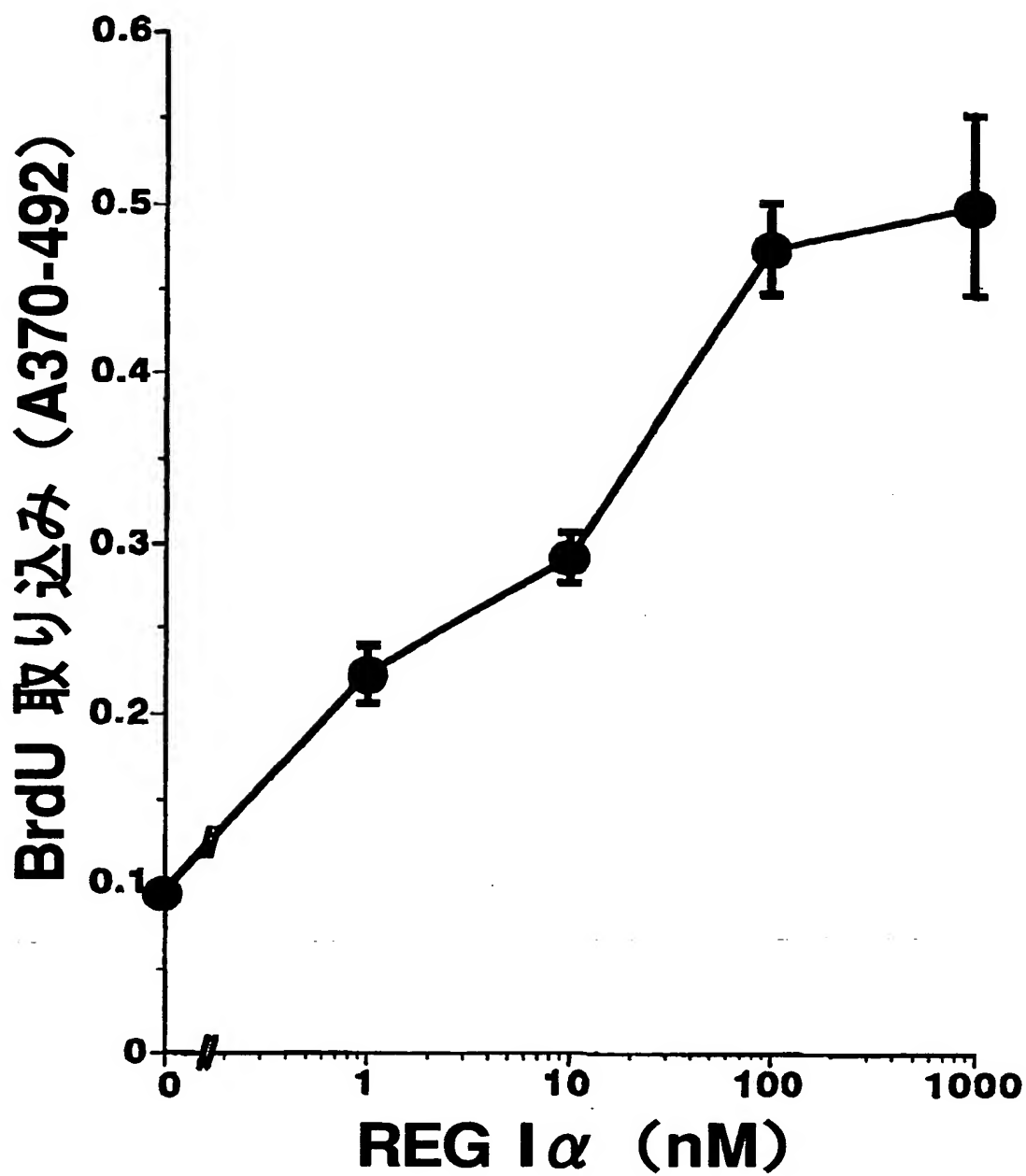
RINm5F細胞に [ $^{125}$ I] 標識したラットReg蛋白質 (Reg I) を添加したときの細胞への結合を測定した結果を示す。「Hot」は標識したラットReg蛋白質のみ、「Hot + 100 $\times$ Cold」は、標識したラットReg蛋白質と100倍量の非標識ラットReg蛋白質を共に添加したときの結果を表す。

【図 3】

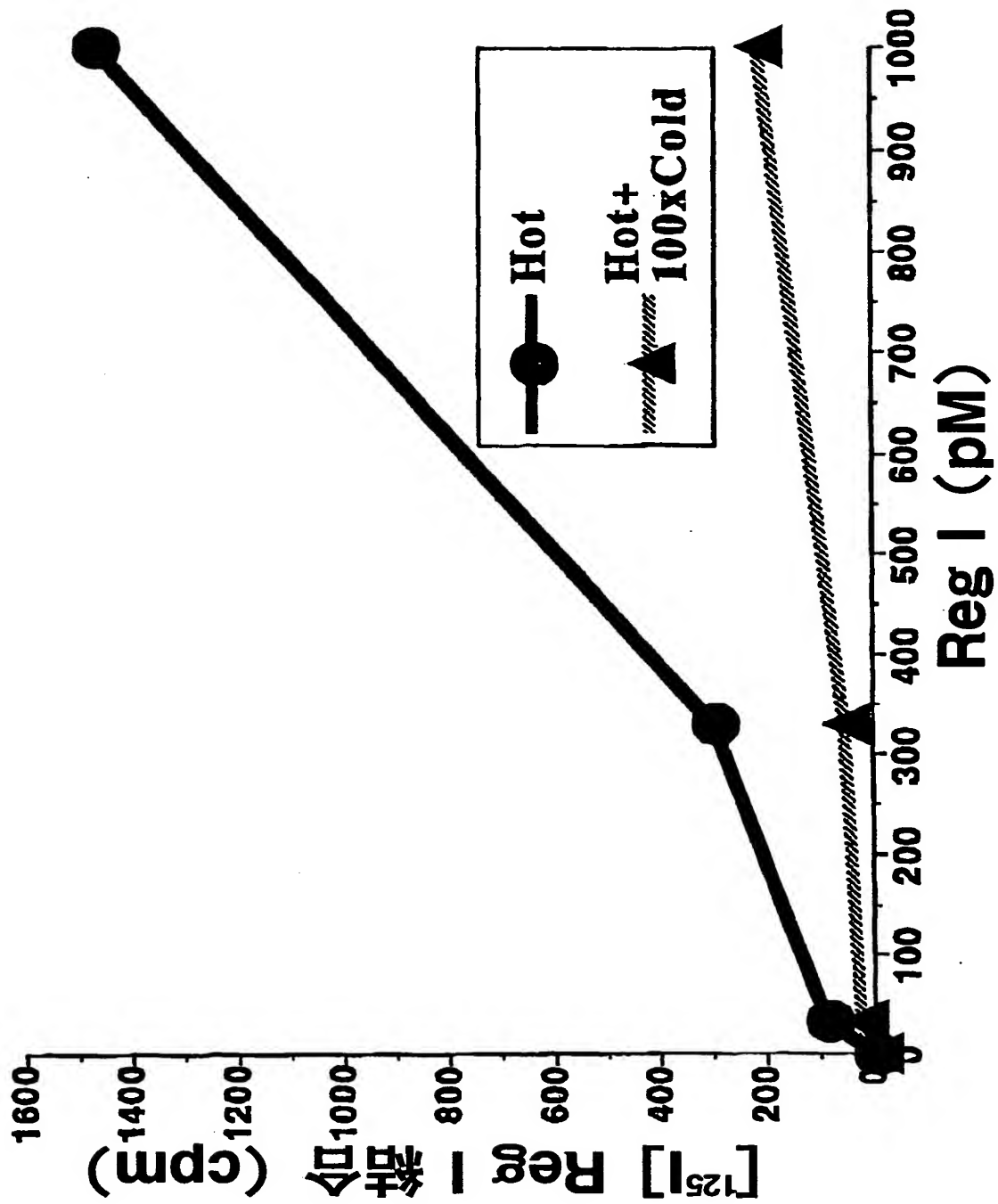
単離されたReg結合蛋白質をCOS-7細胞で発現させ、 [ $^{125}$ I] 標識したラットReg蛋白質 (Reg I) を添加したときの細胞への結合を測定した結果を示す。「pCI-neo」は空ベクター、「pCI-167.1」はReg結合蛋白質発現ベクターを導入した細胞の結果を表す。また、(-)は標識したラットReg蛋白質のみ、(+)は標識したラットReg蛋白質と100倍量の非標識ラットReg蛋白質を共に添加したときの結果を表す。

【書類名】 図面

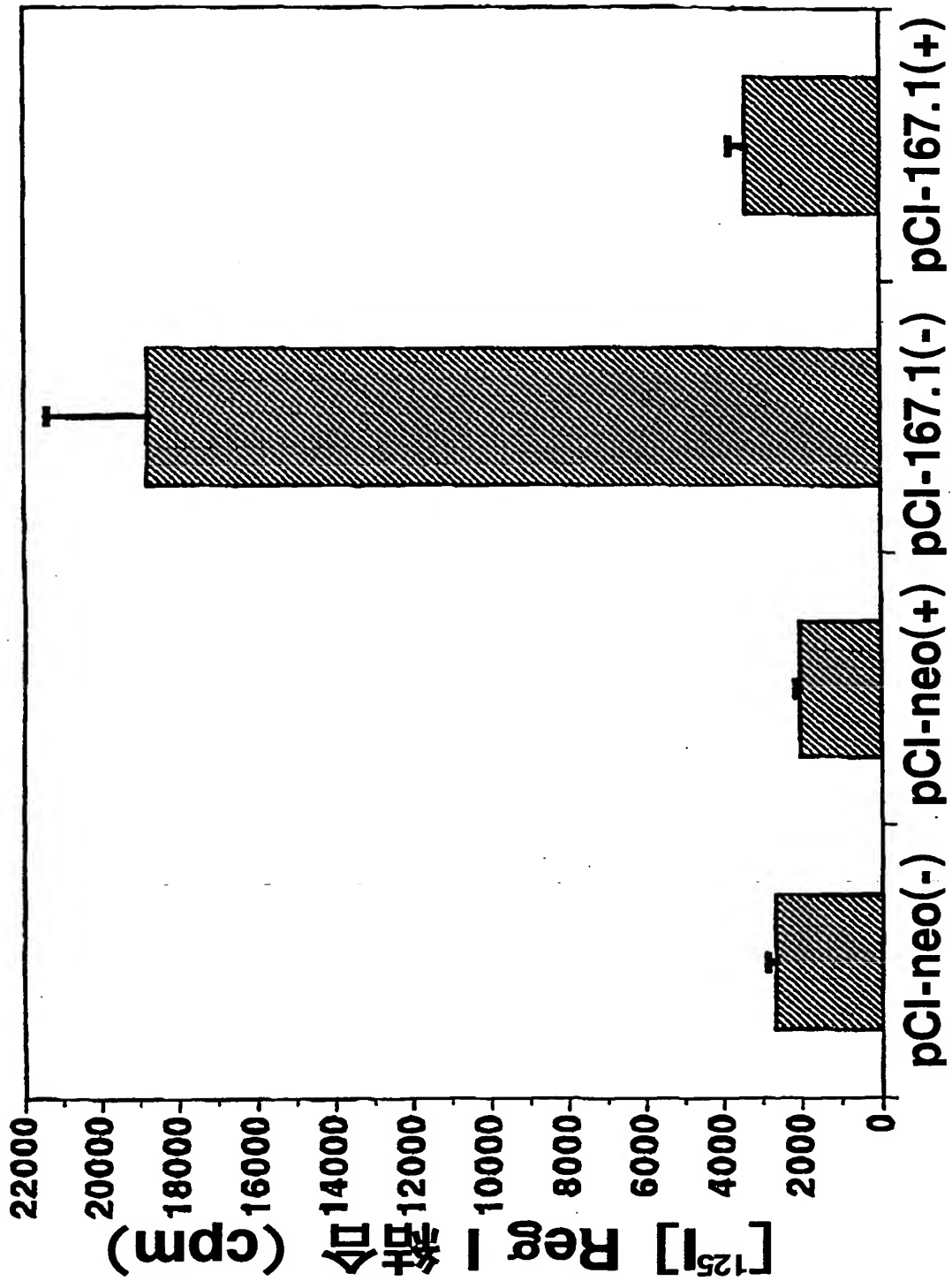
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 Reg蛋白質に結合する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 ラット膵ランゲルハンス島由来cDNAからReg蛋白質に結合する蛋白質をクローニングすることに成功した。COS細胞の細胞表面に発現させた該蛋白質は、Reg蛋白質と特異的に結合することが判明した。該蛋白質は、 $\beta$ 細胞などの細胞表面に発現するReg受容体として機能しており、 $\beta$ 細胞の細胞増殖を制御していると考えられる。該蛋白質やその遺伝子は、糖尿病の新しい治療薬開発のために有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 164488 号
受付番号	59900553908
書類名	特許願
担当官	深沢 敏 2307
作成日	平成 11 年 6 月 21 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	599047790
【住所又は居所】	宮城県仙台市青葉区角五郎 2 丁目-15-3-2 05

【氏名又は名称】	岡本 宏
----------	------

【代理人】

申請人

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】	清水 初志
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】	橋本 一憲
----------	-------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 9 0 4 7 7 9 0 ]

1. 変更年月日 1 9 9 9 年 4 月 7 日

[変更理由] 新規登録

住 所 宮城県仙台市青葉区角五郎 2 丁目 - 1 5 - 3 - 2 0 5

氏 名 岡本 宏